

**RIBOSOMALE PROTEINE:
PROTEINMUSTER
KÜNSTLICHER UND NATÜRLICHER
RIBOSOMALER SUBPARTIKEL
VON ESCHERICHIA COLI**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Adelheid Homann
aus Duisburg**

1972

Ribosomale Proteine:

Proteinmuster künstlicher und natürlicher ribosomaler
Subpartikel von *Escherichia coli*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Adelheid Homann

aus

Duisburg

Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann und Herrn Dr. K. Nier-
haus danke ich für die Anleitung und die tatkräftige
Unterstützung meiner Arbeit.

Inhalt:

I. Zusammenfassung	Seite 3
II. Einleitung	Seite 4
III. Material und Methoden	
1) Puffer	Seite 6
2) Isolierung der Untereinheiten	Seite 7
3) Isolierung d. biogenetischen Vorläufer	Seite 11
4) Präparation der "core" Partikel	Seite 12
5) Präparation der rekonstituierten ribosomalen Zwischenstufe (RI-Part.)	Seite 13
6) Präparation der Proteine für die zweidimensionale Elektrophorese	Seite 14
7) Darstellung der 5S RNA	Seite 14
IV. Ergebnisse	
1) Vorstufen und Untereinheiten von 50S	Seite 15
2) 21 Vorstufen und Unterstufen v. 30S	Seite 16
3) Einbau der 5S RNA	Seite 17
V. Diskussion	
50S Untereinheit	Seite 18
30S Untereinheit	Seite 22
Biosyntheschema	Seite 25
VI. Tabellen und Abbildungen	Seite 27
VII. Literatur	Seite 56
Lebenslauf	Seite 60



I. Zusammenfassung

- 1) Die 43S Vorstufe der ribosomalen 50S Untereinheit zeigt ein Proteilmuster, das dem eines im CsCl Gradienten von 50S Untereinheiten gewonnenen "core" Partikels sehr ähnlich ist.
- 2) Bei den "core" Partikeln der 50S Untereinheit, die entweder durch CsCl - Behandlung oder durch Inkubation mit steigenden LiCl - Konzentrationen entstehen, werden die Proteine nacheinander in fünf Gruppen (Seite 20) abgespalten.
- 3) Das Proteilmuster der 21S Vorstufe der ribosomalen 30S Untereinheit wurde mit dem des RI - Partikels und dem eines "core" Partikels der 30S Untereinheit, das nach 1 M LiCl - Behandlung isoliert wurde, verglichen. Das 21S Partikel ähnelt sowohl dem RI - Partikel als auch dem "core" Partikel. Dagegen weisen RI - Partikel und "core" Partikel einen etwas größeren Unterschied in der Proteinzusammensetzung auf.
- 4) Das 5S RNA - Molekül ist in den untersuchten natürlichen Vorstufen der 50S Untereinheit, nämlich 32S und 43S, bereits vorhanden.
- 5) Die Anlagerung der Proteine während der Biosynthese der Ribosomen erfolgt schrittweise in Gruppen, deren Zusammensetzung in einem Stufendiagramm (Seite 25) angegeben ist.

II. Einleitung

Ribosomen aus Bakterien haben eine Sedimentationskonstante von 70S und bestehen aus einer kleinen 30S Untereinheit und einer doppelt so schweren 50S Untereinheit. Es konnte von Kaltschmidt und Wittmann (1970b) gezeigt werden, daß die kleine ribosomale Untereinheit von *Escherichia coli* aus 21 verschiedenen Proteinen und einem 16S RNA - Molekül, und die große Untereinheit aus 34 verschiedenen Proteinen und zwei RNA - Molekülen (5S und 23S) aufgebaut ist. Eine derart komplizierte Struktur, wie sie eine Untereinheit darstellt, kann von der Zelle nicht in einem Schritt synthetisiert werden. Die stufenweise Biosynthese ist von mehreren Autoren (McCarthy et al., 1962; Otaka et al., 1967; Mangiarotti et al., 1968; Sells und Davies, 1970) untersucht worden. Ihre Forschungsergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

16S RNA	+ 1.Gruppe Protein	→	21S
21S	+ 2.Gruppe Protein	→	30S Untereinheit
23S RNA	+ 1.Gruppe Protein	→	32S
32S	+ 2.Gruppe Protein	→	43S
43S	+ 3.Gruppe Protein	→	50S Untereinheit

In welcher Stufe die 5S RNA integriert wird, war bisher noch nicht bekannt.

Es ist möglich aus den Strukturelementen in vitro eine funktionsfähige Untereinheit herzustellen (Traub und Nomura, 1969; Nomura und Erdmann, 1970). Im Falle der kleinen Untereinheit verläuft die Rekonstitution über eine 21S Zwischenstufe (RI - Partikel, reconstitution intermediate).

Erst nach Zufuhr von Energie, in diesem Falle Hitzeaktivierung, ist die 21S Zwischenstufe in der Lage, die restlichen Proteine aufzunehmen und sich damit zu einer funktionsfähigen 30S Untereinheit zu vervollständigen.

Durch Salzbehandlung werden Proteine aus den Ribosomen herausgelöst. Auch die Proteinabspaltung scheint stufenweise zu erfolgen. Dieser Prozeß läßt sich durch die Veränderung folgender Parameter verfolgen: Erhöhung der Salzkonzentration, Verminderung der Mg^{++} -Konzentration, Veränderung der Ribosomenkonzentration, des pH - Wertes, der Temperatur oder der Inkubationszeit. (Meselson et al., 1964; Nomura et al., 1969; Traub et al., 1967; Hosokawa et al., 1966; Gesteland und Staehelin, 1967; Marcot - Queiroz und Monier, 1966; Atsmon et al., 1967; Lerman et al., 1966; Itoh et al., 1968). Eine Beziehung der durch Salzbehandlung erhaltenen Partikel zu den verschiedenen Vorstufen ist von verschiedenen Autoren diskutiert worden. (Lerman et al., 1966; Itoh et al., 1968).

Die Aufgabe dieser Arbeit war es zunächst, die genannten Zwischenstufen, die bei der Biosynthese der ribosomalen Untereinheiten, bei der in vitro Rekonstitution und bei Salzbehandlung der Ribosomen entstehen, zu isolieren. Sodann galt es, mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamid - Elektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann (1970 a) festzustellen, welche Proteine in den genannten Zwischenstufen enthalten sind. Schließlich sollte eine Korrelation zwischen den verschiedenen Partikeln hergestellt und aus den Ergebnissen nähere Einzelheiten über die Biosynthese der Ribosomen, ihre in vitro Rekonstitution und - soweit möglich - ihre Topographie erhalten werden.

III. Material und Methoden

1) Tabelle der verwendeten Puffer:

Puffer 1: $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ Tris HCl, pH 8.0, 10^{-2} M Mg-Acetat;

Puffer 2: (der TMA I Puffer von Traub und Nomura)
 10^{-2} M Tris HCl; pH 7.8, 10^{-2} M MgCl_2 , $3 \times 10^{-2} \text{ M}$
 NH_4Cl , $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 3: 10^{-2} M Tris HCl, pH 7.8, 10^{-2} M MgCl_2 , $5 \times 10^{-2} \text{ M}$
 NH_4Cl , $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 4: 10^{-2} M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.6, 10^{-3} M MgCl_2 ,
 $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 5: (Puffer III von Traub und Nomura, 1968)
 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ H_3PO_4 , pH 7.8, $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ MgCl_2 ,
 1 M KCl, $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 6: (Puffer IV von Traub und Nomura, 1968)
 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ H_3PO_4 , pH 7.8, $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ MgCl_2
 0.25 M KCl, $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 7: (Standardpuffer von Traub und Nomura, 1968)
eine 1:20 Mischung von Puffer 5 : Puffer 6;

Puffer 8: $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ Tris HCl, pH 7.4, $4 \times 10^{-2} \text{ M}$ MgCl_2 ,
 $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 9: $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ Tris HCl, pH 7.4, $1.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ MgCl_2 ,
 $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 10: $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ Tris HCl, pH 7.4, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ MgCl_2 ,
 $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 11: 10^{-2} M Tris HCl, pH 7.8, 10^{-2} M MgCl_2 ,
 $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mercaptoäthanol;

Puffer 12: 10^{-2} M Tris HCl, pH 7.8, 10^{-2} M Mg-Acetat,
 6×10^{-2} M KCl, 6×10^{-3} M Mercaptoäthanol;

Puffer 13: 5×10^{-2} M K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7.2, 10^{-3} M $MgSO_4$;

2) Isolierung der Untereinheiten:

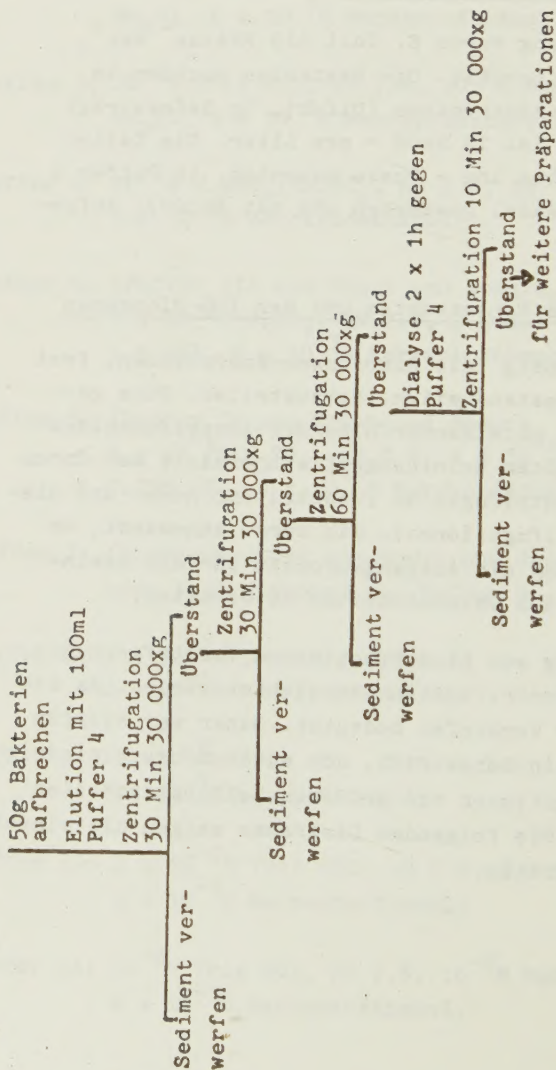
Für die Untersuchung wurde E. Coli A19 RNAase⁻ Met⁻, (Gesteland, 1966) benutzt. Die Bakterien wuchsen im Vollmedium: 10g Bactotryptone (Difco), 5g Hefeextrakt (Difco), 5g NaCl, 1ml 1N NaOH - pro Liter. Die Zellen wurden in der späten log - Phase geerntet, in Puffer 1 (mit $2.5 \mu\text{g/ml}$ DNAase) gewaschen und mit $Al(OH)_3$ aufgeschlossen.

a) Präparation des Rohextraktes und der 70S Ribosomen

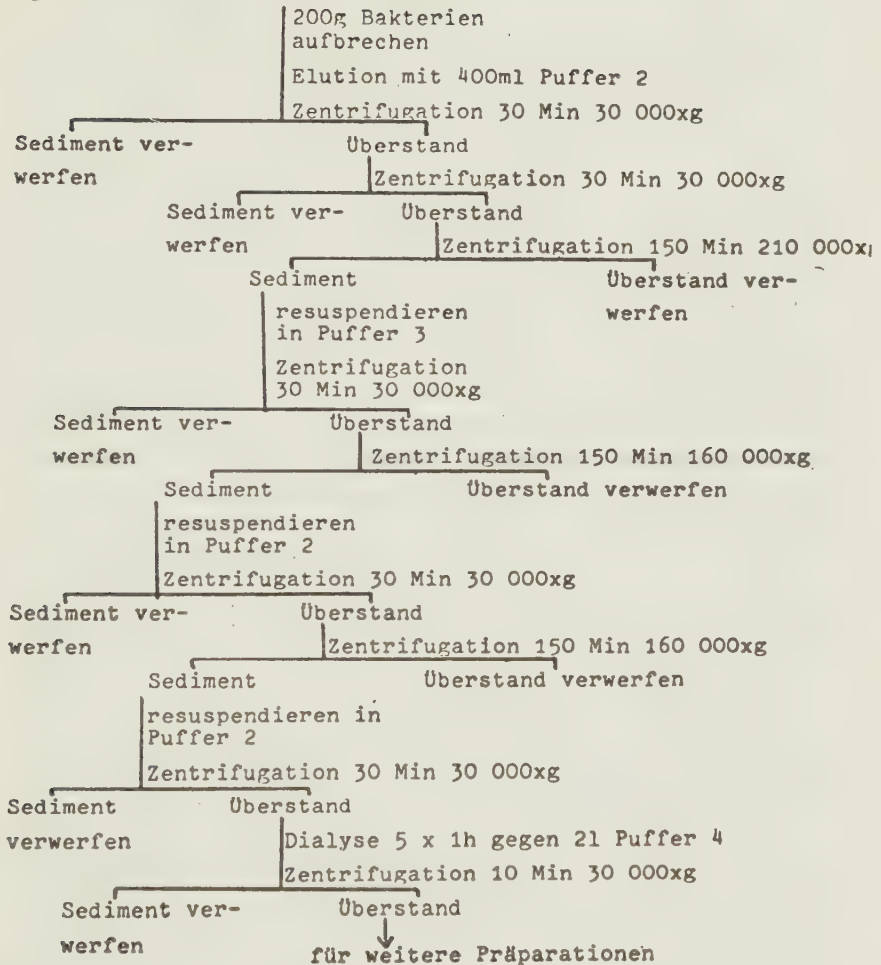
Zunächst ist es nötig die Ribosomenpräparationen, frei von anderen Zellbestandteilen, herzustellen. Dies geschieht mit Hilfe aufeinanderfolgender Zentrifugations-schritte. Den größten Reinigungseffekt erzielt man durch differentielle Zentrifugation (Wechsel von hoch- und niedertourigen Zentrifugationen). Sie wurde angewandt, um reine 70S Ribosomen als Ausgangsprodukt für die Gewinnung von 30S und 50S Untereinheiten zu erhalten.

Für die Isolierung von biosynthetischen Vorstufen mußte auf hochtourige Zentrifugation verzichtet werden, da sie einen Verlust der Vorstufen bedeutet. Daher war hierfür Ausgangsprodukt ein Rohextrakt, der durch mehrere niedrigtourige Zentrifugationen von größeren Zellbestandteilen gereinigt wurde. Die folgenden Diagramme zeigen die einzelnen Reinigungsschritte:

a₁) Rohextrakt



a₂) 70S Präparation



b) Zonalzentrifugation:

Bei der Auftrennung der Ribosomen in Untereinheiten und biosynthetische Vorstufen kann man sich die verschiedenen Sedimentationskonstanten der Partikel zunutze machen. Läßt man ein Partikelgemisch im Sucrosegradienten sedimentieren, so wird die Sedimentation mit steigender Sucrosekonzentration stärker behindert. Es kommt zu einer Auftrennung der verschiedenen Partikel und zu einer Kosedimentation gleicher Partikel in definierten Banden..

Die Zentrifugation im Sucrosegradienten wurde hier im B XV Ti Zonalrotor durchgeführt. Es wurde ein hyperbolischer Gradient nach zwei Methoden hergestellt: a) 800ml Volumen von 15% - 38% Sucrose in Puffer 4, gefolgt von 70ml Probe mit 7.5% Sucrose, danach mit Puffer 4 bis zum Gesamtvolumen des Rotors aufgefüllt; b) 1500ml Sucrose (0% - 38%) in Puffer 4, gefolgt von 50 - 70ml Probe, die invers (6.5% - 0% Sucrose) aufgetragen wurde. Die Zentrifugation erfolgte 17 h bei 25 000 Upm. Für den hyperbolischen Sucrosegradienten wurden die Angaben von Eickenberry et al. (1970) zugrunde gelegt.

Es wurden 70 ml - Proben Rohextrakt mit 10mg/ml Ribosomen und 50ml - Proben 70S mit 20 - 30mg/ml Ribosomen auf den Gradienten aufgetragen. Nach der Zonalzentrifugation wurde mit 50%iger Sucrose in 10ml - Fraktionen ausgepumpt und spektrophotometrisch bei 290nm die Ribosomen enthaltenen Fraktionen ermittelt. Diese Fraktionen wurden gesammelt² und die Partikel durch 15 h Zentrifugation bei 176 000xg sedimentiert. Der verwendete Gradient hatte sich in den Grenzen der aufgetragenen Mengen als vorteilhaft für die Auftrennung der gewünschten Partikel erwiesen. Das galt sowohl für die 30S und 50S Untereinheiten als auch für die 21S, 32S und 43S Vorstufen(Abb.1A - 1E).

3) Isolierung der biogenetischen Vorläufer (21S, 32S, 43S)

a) Die 21S und 43S Partikel konnten aus den Zonalläufen mit Rohextrakt gewonnen werden. Die 21S Fraktionen wurden an der Frontseite des 30S Gipfels gesammelt, die 43S Fraktionen zwischen 30S und 50S Gipfel. (Abb.1B)

Zur Gewinnung der 32S Partikel mußte die Rohextrakt-Behandlung abgewandelt werden. Um den Anteil an dissoziierten 30S und 50S möglichst gering zu halten, setzten wir die Mg^{++} Konzentration herauf. Die dadurch erzwungene Assoziation von 30S und 50S zu 70S Partikeln vergrößert den relativen Anteil der nicht assoziierbaren 32S Vorstufen unter den 30S Ribosomen. Wir untersuchten sechs Puffer mit unterschiedlichen Anionen- und Kationenzusammensetzungen, um die günstigsten Bedingungen für die Assoziation von 30S und 50S zu finden. Die Ribosomen wurden bis zum Gleichgewicht gegen diese Puffer dialysiert. Durch analytische Ultrazentrifugation schätzen wir mit der Schlierenoptik den Anteil der assoziierten 70S Ribosomen. Der für unsere Zwecke geeignetste Puffer enthielt neben Tris HCl und Mercaptoäthanol $10^{-2}M$ Mg-Acetat und $1M$ NH_4Cl . Da wir befürchteten, daß diese hohe Ionenkonzentration ribosomale Proteine abwaschen könnte, entschieden wir uns für Puffer 12, da auch hierbei die Assoziation der Untereinheiten zu 70S Ribosomen groß war. (Abb.2). Zur besseren Trennung im Sucrosegradienten entfernten wir einen großen Teil der 70S Ribosomen durch eine einstündige Zentrifugation bei 160 000xg, bevor die Zonalzentrifugation, wie oben beschrieben, stattfand. Die 32S Fraktionen wurden am absteigenden Schenkel des 30S Gipfels gesammelt. (Abb.1D).

Zur Reinigung der 21S, 32S und 43S Fraktionen mußte perzonalisiert werden, (im Falle von 21S und 32S Partikeln sogar zweimal), Die Fraktionen mit 21S, 32S bzw. 43S wurden gesammelt und die Partikel durch Zentrifugation bei 160 000xg für 15 h oder durch Alkoholfällung gewonnen. Die Aufbewahrung erfolgte in Puffer 4 bei $-20^{\circ}C$. Zur sofortigen Dar-

stellung von RNA oder Protein resuspendierten wir in $10^{-3}M$ MgAcetat. In Tabelle 1 sind Ausgangsmengen und Ausbeuten zusammengestellt.

b) Alkoholfällung: Die Fällung der ribosomalen Partikel folgte der von Roth (1971) beschriebenen Methode.

c) Reinheitskriterien: Die Untersuchung der 43S Partikel in der analytischen Ultrazentrifuge mit der UV- und Schlierenoptik zeigte eine 15%ige Verunreinigung durch 50S Ribosomen (Abb. 3A). Mit der UV-Optik wurde nachgewiesen, daß die 21S Vorläufer frei von 30S Partikeln sind (Abb. 3B). Die Analyse der 32S ergab, daß keine 50S Partikel vorhanden sind, und 43S zu höchstens 10% (siehe auch Abb. 1E). Die RNA-Säulenchromatographie, die unten beschrieben wird, zeigt eine Verunreinigung der 32S durch 30S Partikel von maximal 15%. Als Sedimentationswerte ergaben sich bei 21S: 21,6, bei 32S: 34.2 und bei 43S: 43.7.

4) Präparation der "core" Partikel

a) CsCl Gleichgewichtszentrifugation: Die Behandlung mit CsCl folgte im wesentlichen den bei Meselson et al., 1964, und Traub et al., 1968, beschriebenen Methoden. Es wurden drei verschiedene Mg^{++} Konzentrationen gewählt, bei denen unterschiedliche und definierte Partikel zu erwarten waren (Meselson et al., 1964). Jedes der Inkubationsgemische enthielt 20mg Ribosomenuntereinheiten und 4.9M CsCl in 5ml Puffer 8,9 bzw. 10. Die Gleichgewichtszentrifugation geschah im SW 65 Ti Rotor bei 90 000xg für 36 h (bei $12^{\circ}C$ wegen der hohen Konzentration von CsCl). Um den Abspaltungseffekt des Cs^{+} nicht durch Schwermetallionen zu beeinträchtigen, wurden die Zentrifugenröhrchen vorher mit $10^{-3}M$ EDTA und anschließend in aqua dest. ausgekocht. Die "core" Partikel wurden gewonnen, indem die Zentrifugenröhrchen unterhalb der sichtbaren Banden angestochen, die Banden

⁺EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz

abgesaugt und jeweils gegen Puffer 8,9 bzw. 10 dialysiert wurden.

Bei jeder Mg^{++} Konzentration wurde ein verschiedenes "core" Partikel - Präparat erhalten und zwar: Bei $4 \times 10^{-2}M$ $MgCl_2$ das Partikel Cs - CP - 1 mit der Dichte $\rho = 1.634g/cm^3$, bei $1.5 \times 10^{-2}M$ $MgCl_2$ Cs - CP - 2 mit $\rho = 1.641g/cm^3$ und bei $2 \times 10^{-3}M$ $MgCl_2$ Cs - CP - 3 mit $\rho = 1.663g/cm^3$.

b) Präparation der LiCl Partikel: Bei der Darstellung von LiCl "core" Partikeln wurde versucht zu vermeiden, daß Auffaltungs- oder Aggregationseffekte die Abspaltung der Proteine durch LiCl überlagern. Die Parameter Inkubationsdauer, pH Wert, Konzentration der Ribosomen und der anderen Salze wurden so gewählt, daß möglichst nur LiCl bei der Abspaltung wirkte. (Spitnik-Elson and Atsmon, 1969), 30S und 50S Untereinheiten wurden gegen Puffer 11 dialysiert und dann mit 0.0M, 0.2M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.0M, 1.5M, 2.0M, 3.0M bzw. 4.0M LiCl für 5h bei $4^{\circ}C$ inkubiert. Das Inkubationsgemisch enthielt 6ml Untereinheiten (1mg/ml), $10^{-2}M$ Tris HCl, pH 7.8, $10^{-2}M$ $MgCl_2$, $10^{-4}M$ EDTA und die jeweilige Menge LiCl. Nach der Inkubation wurden die Partikel durch eine Zentrifugation bei 160 000xg für 5h sedimentiert und anschließend in Puffer 11 resuspendiert.

5) Präparation der rekonstituierten ribosomalen Zwischenstufe (RI - Partikel)

Ausgangsprodukt für die RNA- und Proteindarstellung waren 30S Untereinheiten. Die Rekonstitution folgte im wesentlichen Traub und Nomura (1969) mit folgenden Änderungen: Ein Gemisch aus 12ml 30S in Puffer 4 mit 300 A_{260} Einheiten, 1.2ml 10%iges ^{+}SDS und 11ml Phenol - gesättigt mit Puffer 4 - wurde 8 Min in der Kälte geschüttelt und dann 5 Min bei 17 000xg zentrifugiert. Nach Wiederholung der Phenolbehandlung mit der wässrigen Phase (ohne SDS) erhielten wir reine,

^{+}SDS = Natriumdodecylsulfat

unversehrte 16S RNA (geprüft mit der analytischen Ultrazentrifuge, Abb.4).

Nach 30 Min Inkubation des Rekonstitutionsgemisches bei 0°C wurden die RI - Partikel 12h bei 63 000xg zentrifugiert und in Puffer 7 resuspendiert. Alle Operationen geschahen mit sterilisierten Geräten.

6) Präparation der Proteine für die zweidimensionale Elektrophorese

Die verschiedenen Partikelpräparationen wurden nach Anhebung der Mg^{++} Konzentration auf 0.1M 45 Min in 66%iger Essigsäure bei 0°C gerührt. Eine Zentrifugation bei 30 000xg für 30 Min entfernte die gefällte RNA. Die Proteinlösungen wurden zunächst gegen 8M Harnstoff in 66%iger Essigsäure dialysiert, dann gegen trockenes Sephadex 200 zur Einengung des Volumens und schließlich gegen Obergel ohne Riboflavin und Peroxodisulfat (Kaltschmidt und Wittmann, 1970 a).

7) Darstellung der 5S RNA

100 A_{260} Einheiten 32S bzw. 43S Partikel wurden in 4ml Puffer 4 gelöst. Nach Zugabe von 1/20 Volumen 2%igem Bentonite, 1/50 Volumen 10%igem SDS, 1/10 Volumen $10^{-1}M$ EDTA und 1 Volumen 80%igem Phenol (in ^{+}SSC EDTA $10^{-2}M$, pH 7.0) wurde 5 Min bei 4°C geschüttelt und 10 Min bei 17 000xg zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Prozedur - einmal ohne EDTA, ein zweites Mal nur mit Phenol - wurde die RNA durch Alkoholfällung konzentriert, und zwar durch Inkubation mit 1/100 Volumen 4M KCl, pH 5.6 und 2 Volumen absolutem Äthanol p.a. für 6h bei -20°C. Resuspendierung erfolgte in 2ml Puffer 15.

Die Trennung der 5S RNA von der 23S RNA gelang durch Sepharose 4B - Chromatographie (Säulendimension: 48 x 2.5cm). Die Säule wurde mit Puffer 15 equilibriert. Das Auftragsvolumen betrug 2ml RNA-Lösung. Um das Gelvolumen zu Gunsten

^{+}SSC = Natriumchlorid + Natriumcitrat

einer gleichmäßigen Durchflußrate und damit einer exakten Trennung konstant zu halten, fixierten wir den Pufferdruck während der Elution mit Hilfe einer Boyle - Mariotte - Flasche auf 40cm Wassersäule. Die Extraktion geschah mit Puffer 1 in 40-Tropfen-Fractionen (2.5 ml). Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 13.5ml pro h. Mit dieser Methode erhielten wir eine gute Auftrennung von 23S RNA, 5S RNA und Resten von 16S RNA (Abb.5A).

Um auszuschließen, daß während der Präparation das 23S RNA Molekül in Fragmente zerfällt, die im 16S und 5S Bereich erscheinen, wurden die 23S Fractionen erneut gefällt und aufgetragen. Abbildung 5B zeigt, daß die Integrität der 23S Moleküle bewahrt wurde.

IV. Ergebnisse

1) Vorstufen und Untereinheiten von 50S

a) 32S Vorstufen: Die Proteinmuster von 50S und Subpartikeln wurden durch die zweidimensionale Elektrophorese erhalten. Abbildung 6 zeigt die Proteine des 50S Ribosom, Abbildung 7 die der 32S Vorstufe. An Hand der Intensitäten können vier Proteingruppen definiert werden. Bei der 32S Vorstufe gibt es in der ersten Gruppe elf Proteine (L1, L4, L13, L17, L18, L21, L22, L23, L24, L29, L30), die gleichermaßen in 50S und 32S zu finden sind. Die zweite Gruppe enthält vier bis fünf Proteine (L8/L9, L10, L27, L33), deren Anteil am 32S Partikel geringer ist als am 50S Ribosom. Die neun Proteine der dritten Gruppe (L3, L5, L6, L7, L11, L15, L19, L20, L25) sind im 32S Partikel nur noch in Spuren vorhanden. Die vierte Gruppe mit sieben Proteinen (L2, L12, L14, L16, L28, L31, L32) fehlt völlig.

b) 43S Vorstufen: (Abb.8) Gegenüber dem 32S Vorläufer sind hier die Proteine L1, L3, L4, L7, L9, L11, L13, L15, L17, L2, L18, L19, L21, L22, L24, L29, L30, L32 und L33 in der ersten Gruppe vorhanden. Zu Gruppe vier gehören nur noch L12,

L14, L28 und L31. Die weitere Zusammensetzung und der Unterschied zu den 50S und 32S Proteinsternen ergibt sich aus Tabelle 2.

C) CsCl "core" Partikel von 50S: (Abb. 9A-9C) Dem "core" Partikel Cs - CP - 1 (CsCl Gradient mit $4 \times 10^{-2} \text{M}$ MgCl_2) fehlen vier Proteine des 50S Ribosoms (L14, L16, L20, L33). Weitere Proteine waren im Cs - CP - 2 abgespalten ($1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ MgCl_2) : L1, L7, L8, L10, L12, L25, L28, L31. Im Cs - CP - 3 ($2 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2) fehlen zusätzlich: L6 und L27. (Tabelle 2)

d) LiCl "core" Partikel von 50S: (Abb. 10A-10G) Die Inkubation der 50S Ribosomen mit 0.6M, 1M, 2M bzw. 4M LiCl ergab eine schrittweise Dissoziation der Proteine. Nach Inkubation in 4M LiCl waren nur noch fünf Proteine in normalem Maße im "core" enthalten: L3, L4, L13, L21 und L22. Nach der 2M LiCl Inkubation sind elf Proteine deutlich vorhanden, nach der Behandlung mit 1M LiCl bleiben 16 Proteine in normaler Menge, ein Protein reduziert und eines nur spurenweise (Tabelle 3).

2) 21S Vorstufen und Unterstufen von 30S

a) 21S Vorstufen: (Abb. 12) Die Proteine von den 21S Vorstufen sowie die vom RI Partikel und den LiCl "core" Partikeln werden in Tabelle 4 aufgeführt. Unter den angegebenen Bedingungen war es nicht möglich CsCl Partikel vom 30S Ribosom zu isolieren.

Die 21S Vorstufe enthält sieben Proteine (S1, S4, S5, S8, S15, S16, S17) in gleicher Menge wie die 30S Untereinheit (Abb. 11). Der Gehalt an S13 und S20 ist reduziert, S7 ist nur spurenweise vorhanden. Elf Proteine (S2, S3, S6, S9, S10, S11, S12, S14, S18, S19, S21) fehlen.

b) RI Partikel: (Abb. 13) Acht Proteine (S4, S5, S6, S8, S13, S15, S16, S17) sind in vollem Umfang vorhanden. S1, S18, S20 und S21 sind in ihrer Menge reduziert, S2 und S9 sind spurenweise erhalten und sieben Proteine (S3, S7, S10, S11, S12, S14, S19) des 30S Ribosoms fehlen.

c) LiCl "core" Partikel: (Abb. 14A-14B) Bei der Behandlung der 30S Untereinheiten mit 1M LiCl dissoziieren acht Proteine ((S3, S9, S10, S11, S12, S14, S18, S21) vollständig und drei Proteine (S2, S13, S20) teilweise. Nach Inkubation mit 2M LiCl wird eine weitere Gruppe (S1, S13, S19, S20) völlig abgespalten. Neun Proteine bleiben mehr oder weniger im "core" vorhanden. (Tabelle 4)

Die Behandlung von 50S Untereinheiten mit 5M und 6M LiCl löste sämtliche Proteine von der ribosomalen RNA. Schon bei Inkubation der 30S Untereinheiten in 3M LiCl wurden keine Proteine mit der zweidimensionalen Elektrophorese gefunden.

3) Einbau der 5S RNA

Dividiert man die Flächen der Gipfel von 5S und 23S RNA durcheinander und setzt sie mit den zugehörigen Molekulargewichten in Relation, so erhält man für die 32S Partikel ein Verhältnis von 5S RNA : 23S RNA = 1.2 : 1. Der relativ zu hohe Anteil der 5S RNA kann dadurch erklärt werden, daß bei der Behandlung mit Phenol ein Teil der 23S RNA Moleküle an den Proteinen in der Phenolphase bleibt. Man muß schließen, daß das 5S RNA Molekül in jedem 32S Partikel enthalten ist, also beim ersten Schritt der 50S Biosynthese eingebaut wird.

V. Diskussion

Ziel der Arbeit war es u.a., die Proteinmuster folgender drei Partikelgruppen zu vergleichen: a) natürlich vorkommende Vorstufen der 30S und 50S Untereinheiten, b) intermediäre Partikel, die bei der Rekonstitution der 30S Untereinheiten ent-

stehen, c) "core" Partikel, die durch Salzbehandlung Proteine verloren haben.

Die Elektrophoretogramme der verschiedenen Partikel wurden untersucht und jedes Partikel einer der in den Tabellen aufgeführten vier Klassen zugeordnet. Zwei Partikel unterscheiden sich nach dieser Definition dann in einem Protein, wenn ein Protein eines Partikels z.B. zur Klasse 1 gehört, das entsprechende eines anderen Partikel zur Klasse 3 oder 4. Ein anderes Beispiel liegt dann vor, wenn in einem Partikel ein Protein der Klasse 2 zuzuordnen ist, im anderen Partikel das entsprechende Protein zur Klasse 4.

Aus den Ergebnissen, die in den Tabellen 2-4 zusammengefaßt sind, können folgende Schlüsse gezogen werden:

50S Untereinheiten

Das Cs - CP - 1 "core" Partikel zeigt eine große Ähnlichkeit mit der 43S in vivo Vorstufe. Beide Partikel unterscheiden sich nur in sechs (L6, L12, L27, L28, L31, L33) von mehr als 30 Proteinen. Schon Otaka et al. (1967) haben eine Ähnlichkeit zwischen einem "40S precursor RNP" und einem durch Salzabspaltung erhaltenen RNP (1.25M LiCl mit 0.1M Mg^{++} , $2.5 \times 10^{-2}M$ Tris HCl, pH 7.4) gezeigt. Dies geschah mit Hilfe von Chromatographie auf CM-Cellulose, die die 50S Proteine in 15 bis 18 Gipfel trennt.

Die 32S Vorstufe zeigt ein der 43S Vorstufe entsprechendes Proteinmuster, bei dem jedoch die Proteine L2, L16, L32 noch nicht vorhanden sind. Außerdem besteht ein quantitativer Unterschied in den Proteinen L3, L5, L7, L11, L15, L19 und L25.

Es gibt keine Ähnlichkeit der 32S Proteine mit denen, die nach Salzabspaltung im "core" verbleiben. Dies läßt vermuten, daß zwischen 32S und 43S Stufe eine Umlagerung der Proteine stattfindet, die beim rückwärtigen Vorgang der Salz-

abspaltung nicht nachvollzogen werden kann. Man könnte annehmen, daß die Proteine, die zuerst abgespalten werden, bei 43S und 50S Partikeln außen liegen, bei der Biosynthese zum Teil aber erst auf der 43S Stufe nach außen geraten sind, z.B. durch Umfaltung des Ribosoms.

Zusätzlich zum Cs - CP - 1 haben wir vier weitere "core" Partikel mit abnehmendem Proteingehalt gefunden (Tabelle 2 und 3): Cs - CP - 2, Cs - CP - 3 = Li - 50 - 1M, Li - 50 - 2M und Li - 50 - 4M.

Die Ähnlichkeit zwischen Partikeln, die durch Behandlung mit verschiedenen Salzen erhalten wurden, ist bemerkenswert. Dies gilt besonders für Cs - CP - 3 und Li - 50 - 1M. Diese Partikel unterscheiden sich nur in drei Proteinen (L2, L11, L25). Die Konzentration von CsCl ($\rho = 1.663 = 5.4M$), die hier benutzt wurde, ist sehr viel höher als die benötigte LiCl Konzentration (1M). Dies kann erklärt werden mit dem größeren Ionenradius des Cs⁺Ions und seiner dementsprechend verringerten Effektivität beim Verdrängen der Proteine. Behandlung mit 0.8M LiCl führt zu gleichen Partikeln wie die Behandlung mit 1M LiCl. Inkubation mit 0.4M und 0.6M LiCl ergibt identische Proteinemuster, die dem des Cs - CP - 2 sehr ähnlich sind: Die LiCl Partikel unterscheiden sich nur in zwei Proteinen (L1, L25) von der Proteinzusammensetzung des Cs - CP - 2.

Die schrittweise Dissoziation der Proteine bei bestimmten LiCl Konzentrationen wird auch bei höherem Salzgehalt gefunden. Zwischen 1M und 1.5M werden vier Proteine (L9, L18, L25, L30) abgespalten, während sich die Proteine mit 1.5M und 2M LiCl behandelten Partikel nur in einem Protein (L5) unterscheiden. Der letzte Dissoziationsschritt tritt zwischen 2M und 3M LiCl auf, Li - 50 - 3M und Li - 50 - 4M sind identisch.

Cs - CP - 2 und Cs - CP - 3 zeigen eine weitgehende Ähnlichkeit; sie unterscheiden sich nur in zwei Proteinen. Das ist auffallend, weil ihre Dichten sehr unterschiedlich sind. Daher ist anzunehmen, daß diese Partikel sich durch ihre Auffaltung unterscheiden. So ist auch zu erklären, daß die Sedimentationswerte von Cs - CP - 2 und Li - 50 - 1M (Abb.15) sehr ähnlich sind, während die Proteinmuster von Li - 50 - 1M und Cs - CP - 3 übereinstimmen.

Bei der Behandlung der 50S Ribosomen mit verschiedenen Konzentrationen von LiCl oder CsCl entstehen fünf verschiedene Partikel: (Die Molaritäten über den Pfeilen geben an, bei welchen LiCl Konzentrationen die Proteine abgespalten werden)

50S	$\xrightarrow[Gruppe I]{5.1M CsCl}$	Cs - CP- 1	
50S	$\xrightarrow[Gruppe I + II]{0.4M LiCl}$	Li - 50 - 0.6M	} vergleichbar mit Cs - CP - 2
50S	$\xrightarrow[Gruppe I, II + III]{0.6-0.8M LiCl}$	Li - 50 - 1M	
50S	$\xrightarrow[Gruppe I, II, III + IV]{1 - 1.5M LiCl}$	Li - 50 - 2M	} vergleichbar mit Cs - CP - 3
50S	$\xrightarrow[Gruppe I, II, III, IV+V]{2 - 3M LiCl}$	Li - 50 - 4M	

Gruppe I: L14, L16, L20, L26, L33

Gruppe II: L1, L7, L8, L10, L25, L28, L31

Gruppe III: (L6, L15, L27) (L2, L11)

Gruppe IV: L5, L9, L18, L25, L30

Gruppe V : L17, L19, L23, L24, L29, L32

Itoh et al. (1968) identifizierten vier Partikel mit verschiedenen Sedimentationswerten nach LiCl Behandlung. Aber leider ist kein Vergleich ihrer Partikel mit unseren an Hand der Proteine möglich, solange die Zuordnung der mit verschiedenen Methoden (Säulenchromatographie und zweidi-

mensionale Elektrophorese) untersuchten Proteine nicht bekannt ist.

Von Stöffler et al. (1971) wurden acht Proteine der 50S Untereinheit gefunden, die in der Lage sind, direkt an das 23S RNA Molekül zu binden. Und zwar L2, L6, L16, L17, L19, L20, L23 und L24. Von diesen Proteinen sind nur L17, L23 und L24 in der 32S Vorstufe enthalten, während in der 43S Vorstufe alle Bindungsproteine bis auf L6, L16 und L20 vorhanden sind. Zu der 43S Vorstufe gibt es also eine recht gute Übereinstimmung, zumal da L20 oft auch bei Proteinpräparationen der 50S Untereinheit fehlt. Der Unterschied zwischen den in der 32S Vorstufe gefundenen Proteinen und den Bindungsproteinen könnte durch eine Umlagerung der ribosomalen Komponenten zwischen der 32S und 43S Vorstufe erklärt werden. Man könnte sich denken, daß nach einer solchen Umlagerung Bereiche der 23S RNA zugänglich werden, die dann von den restlichen Bindungsproteinen besetzt werden können.

Weitere Hinweise auf die Struktur der 50S Untereinheiten lassen sich gewinnen, wenn man Trypsin auf die 50S Ribosomen einwirken läßt (Crichton und Wittmann, 1971) und die Proteine, die sukzessive angegriffen werden, vergleicht mit dem Assoziationsmuster bei der Biosynthese, dem Dissoziationsmuster bei der Salzabspaltung und der Bindungscharakteristik der einzelnen Proteine an die 23S RNA. Die Bindungsproteine L2, L6 und L16 werden von niedrigen Konzentrationen Trypsin und LiCl angegriffen. L6 und L16 fehlen auch in der 43S Vorstufe. Die anderen Bindungsproteine (L7, L9, L20, L23, L24) werden mit LiCl und Trypsin später aus dem Ribosomenverband herausgelöst. Von diesen Proteine sind L17, L23 und L24 in der 32S Vorstufe enthalten. Die Eigenschaft der Proteine an die 23S RNA zu binden, ist im Falle der 50S Untereinheit anscheinend kein Kriterium für ihre Lage im Ribosom.

Zwischen der Reihenfolge bei der Abspaltung von Ribosomen durch LiCl-oder Trypsineinwirkung gibt es eine relativ gute, im einzelnen aber nicht völlig befriedigende Übereinstimmung. Die Proteine L2, L4, L6, L10, L11 und L16 werden von Trypsin rasch verdaut, die Proteine L2, L6, L10, L11, L16, L20 und L28 von niedrigen Konzentrationen LiCl abgespalten. L3, L18, L19, L22, L27, L28, L30 und L32 werden nur langsam von Trypsin angegriffen, L24 gar nicht. Diese Proteine werden auch erst von höheren LiCl Konzentrationen angegriffen. L27 und L28 dissoziieren allerdings früher, L4 sehr spät.

Die Ergebnisse bei der Abspaltung von Proteinen aus der 50S Untereinheit durch Salze und durch Trypsin vermitteln aber trotz der Unterschiede in erster Annäherung eine grobe Topographie der 50S Untereinheit. Sie geben Kenntnis darüber, welche Proteine vermutlich außen, nämlich leicht angreifbar liegen und welche Proteine schwerer zugänglich sind, und deshalb wahrscheinlich innerhalb des Ribosoms liegen.

30S Untereinheit

Es ist möglich, die in vivo vorkommende 21S Vorstufe, das in vitro rekonstituierte RI-Partikel und das Li - 30 - 1M "core" Partikel zu vergleichen. Alle drei Partikel sind einander ähnlich. 21S Vorstufe und RI Partikel unterscheiden sich nur in S6, S18 und S21, 21S Vorstufe und Li - 30 - 1M in S6, S7 und S19. Der Unterschied zwischen RI Partikel und Li - 30 - 1M ist größer, S7, S13, S18, S19, S21 sind nicht gleichmäßig vorhanden.

Guthrie et al. (1969) haben über die Proteinzusammensetzung eines 21S Partikels, das in einer kalt-sensitiven Mutante von E.coli akkumuliert wird, berichtet. Dieses Partikel entspricht der normalen 21S Vorstufe der 30S Untereinheit. Es unterscheidet sich jedoch beträchtlich von der Proteinzusammensetzung der von uns untersuchten 21S Vorstufe, und

Vergleicht man die von uns untersuchten 21S Vorstufe und RI Partikel mit dieser "assembly map", so stellt man fest, daß in beiden Partikeln S7 fehlt, ebenso wie die vom S7 - Einbau abhängigen Proteine S3, S6, S9, S10, S14 und S19. In dem 21S Partikel aus der kalt-sensitiven Mutante von Guthrie ist S7 mit den darauf folgenden Proteinen S6, S9, S19 vorhanden. Ein Teil der unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen könnte daher auf den Unterschied in S7 zurückgeführt werden.

Kurland et al. (1969) zeigten, daß einige Proteine in jeder 30S Untereinheit in einer Kopie enthalten sind (unit proteins), einige sind nicht in allen 30S Untereinheiten vorhanden (fractional proteins), und einige konnten nicht zweifelsfrei einer dieser beiden Gruppen zugeordnet werden (marginal proteins). Bei den durch Salzabspaltung erhaltenen Partikeln der 30S Untereinheit fehlen zunächst die "fractional" Proteine (Tabelle 4), während vor allem die "unit" Proteine im "core" bleiben. So enthält Li - 30 - 1M sechs "unit" Proteine (S4, S6, S7, S16, S17), ein "marginal" Protein (S5) und nur zwei "fractional" Proteine (S1, S19). Ein ähnlicher Vergleich für die 50S Partikel ist noch nicht möglich, da es noch keine verfügbaren Daten über "unit" und "fractional" Proteine gibt.

Vergleicht man die Proteine der 21S Vorstufe und des RI Partikels mit den Bindungsproteinen S4, S7, S8, S15, S20 der 30S Untereinheit (Stöffler et al., 1971), so findet man eine deutliche Übereinstimmung, nur S7 fehlt in den von uns untersuchten Partikeln.

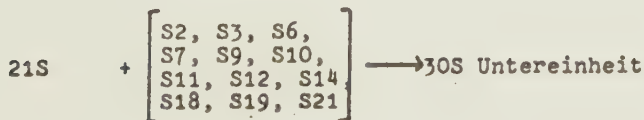
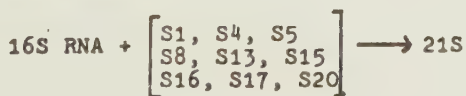
Zieht man für die Betrachtung der 30S Untereinheit zusätzlich die Ergebnisse von Crichton und Wittmann (1971) über die Trypsinverdauung ribosomaler Proteine heran, so findet man: die Proteine, die an die 16S RNA binden und in

der 21S Vorstufe vorhanden sind, werden von Trypsin nur sehr langsam verdaut und von 1M LiCl bis auf S20 nicht abgespalten. S9, S12, S14 und S18 sind keine Bindungsproteine und sind nicht in der 21S Vorstufe enthalten, werden aber von Trypsin langsam verdaut. Durch 1M LiCl hingegen werden diese Proteine abgespalten. S16, das in der 21S Vorstufe enthalten ist aber nicht bindet, wird sowohl von Trypsin als auch von LiCl leicht aus dem Ribosomenverband herausgelöst. Insgesamt kann man annehmen, daß die 30S Untereinheit eine offene Struktur besitzt, so daß die Proteine, die nicht allein an die 16S RNA binden, sowohl für Trypsin als auch für LiCl leicht zugänglich sind.

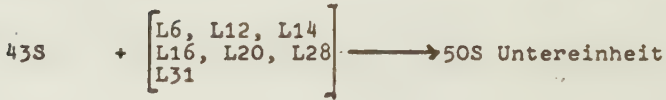
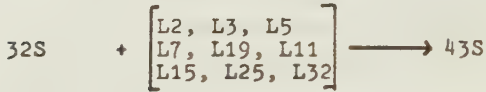
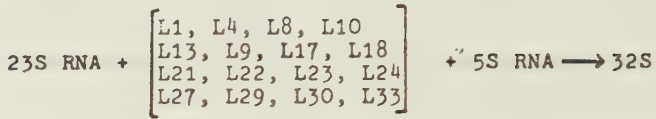
Biosynthese der Ribosomen

Die Ergebnisse der Untersuchungen an ribosomalen Vorstufen können zu folgendem Schema zusammengefaßt werden:

30S Biosynthese:



50S Biosynthese:



VI. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Durchschnittliche Ausbeuten bei den Aufarbeitungen

Präparationsweg	70S Aufarbeitung		Rohextraktaufarbeitung	
	Zonallauf	Abb.	Zonallauf	Abb.
Ausgangsmenge (Bakterien)	200g		50g	
Menge d. Ribosomen (nach Reinigung)	34 000 E ₂₆₀		12 000 E ₂₆₀	
Menge d. Ribosomen nach Entzug d. 70S (für d. Gewinnung v. 32S)	-		7 700 E ₂₆₀	
Auftragsmenge (Zonalzentrifugation)	15 000 E ₂₆₀		12 000 bzw. 7 700 E ₂₆₀	
Mengen d. isolierten Partikel:				
a) 30S	2 100 E ₂₆₀	1a	-	
b) 50S	2 700 E ₂₆₀		-	
c) 21S (aus 4 Zonalläufen)	-		900 E ₂₆₀	
1. rezonal	-		250 E ₂₆₀	1b,c
2. rezonal	-		120 E ₂₆₀	
d) 43S (aus 4 Zonalläufen)	-		1 500 E ₂₆₀	
rezonal	-		450 E ₂₆₀	1b,c
e) 32S (aus 6-8 Zonalläufen)	-		3000 E ₂₆₀	
1. rezonal	-		1200 E ₂₆₀	1d,e
2. rezonal	-		160 E ₂₆₀	

Tabelle 2: Proteinzusammensetzung der 32S und 43S Vorläufer
und der CsCl Partikel von 50S

	32S	43S	Cs-CP-1	Cs-CP-2	Cs-CP-3
L1	+	+	+	-	-
L2	-	+	+	+	+
L3	(+)	+	+	+	+
L4	+	+	+	+	+
L5	(+)	(+)	+	+	+
L6	(+)	(+)	+	+	-
L7	(+)	+	+	-	-
L8	(+)	(+)	+	-	-
L9	(+)	+	+	(+)	(+)
L10	(+)	(+)	(+)	-	-
L11	(+)	+	+	+	+
L12	-	-	(+)	-	-
L13	+	+	+	+	+
L14	-	-	-	-	-
L15	(+)	+	+	+	(+)
L16	-	(+)	-	-	-
L17	+	+	+	+	+
L18	+	+	+	+	+
L19	(+)	+	+	+	+
L20	(+)	(+)	-	-	-
L21	+	+	+	(+)	+
L22	+	+	+	+	+
L23	+	(+)	+	+	+
L24	+	+	+	+	+
L25	(+)	(+)	(+)	-	-
L27	(+)	(+)	+	+	-
L28	-	-	(+)	-	-
L29	+	+	+	+	+
L30	+	+	+	+	+
L31	-	-	(+)	-	-
L32	-	+	+	+	+
L33	(+)	+	-	-	-

Tabelle 3: Proteinzusammensetzung der LiCl-Partikel von 50S

	Li-50- 0M	Li-50- 0.4M	Li-50- 0.6M	Li-50- 0.8M	Li-50- 1M	Li-50- 1.5M	Li-50- 2M	Li-50- 3M	Li- 4M
L1	+	+	+	(+)	(+)	-	-	-	-
L2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L5	+	+	+	+	+	(+)	-	-	-
L6	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-
L7	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L8	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
L9	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L10	+	-	+	-	-	-	-	-	-
L11	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L12	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L14	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
L15	+	+	(+)	-	(+)	-	-	-	-
L16	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-
L17	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
L18	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L19	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L20	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
L21	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-
L22	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L23	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
L24	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L25	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L27	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-
L28	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
L29	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
L30	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L31	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
L32	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	-
L33	+	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+

Tabelle 4: Proteinmuster der 21S Vorstufe und der "core" Partikel von 30S

Berlin Nomenclatur (23)	21S Vorstufe	RI Partikel	Li-30-1M	Li-30-2M	21S Partikel von Nomura et al (21)	Stoichiometrie
S1	+	(+)	(+)	-	-	L
S2	-	(+)	(+)	(+)	-	L
S3	-	-	-	-	-	M
S4	+	+	+	(+)	+	U
S5	+	+	+	(+)	+	U
S6	-	+	+	(+)	+	U
S7	(+)	-	+	(+)	+	U
S8	+	+	+	(+)	+	U
S9	-	(+)	-	-	+	U
S10	-	-	-	-	-	E
S11	-	-	-	-	-	L
S12	-	-	-	-	-	L
S13	(+)	+	(+)	-	-	L
S14	-	-	-	-	-	U
S15	+	+	+	(+)	+	U
S16	+	+	+	(+)	+	U
S17	+	+	+	(+)	+	E
S18	-	(+)	-	-	-	L
S19	-	-	+	-	+	L
S20	(+)	(+)	(+)	-	+	L
S21	-	(+)	-	-	-	L

Erklärung zu Tabelle 2,3 und 4:

In den Tabellen sind die Proteinkompositionen der verschiedenen Subpartikel von 30S (Tabelle 4) und 50S (Tabelle 2 und 3) Untereinheiten zusammengestellt.

+ bedeutet, daß die Proteine in normaler Menge vorhanden sind (Klasse 1),

(+) die Menge der Proteine ist reduziert (Klasse 2),

(+) die Proteine sind nur in Spuren vorhanden, (Klasse 3)

- die Proteine fehlen. (Klasse 4)

Tabelle 4:

u = "unit" Protein

f = "fractional" Protein

m = "marginal" Protein

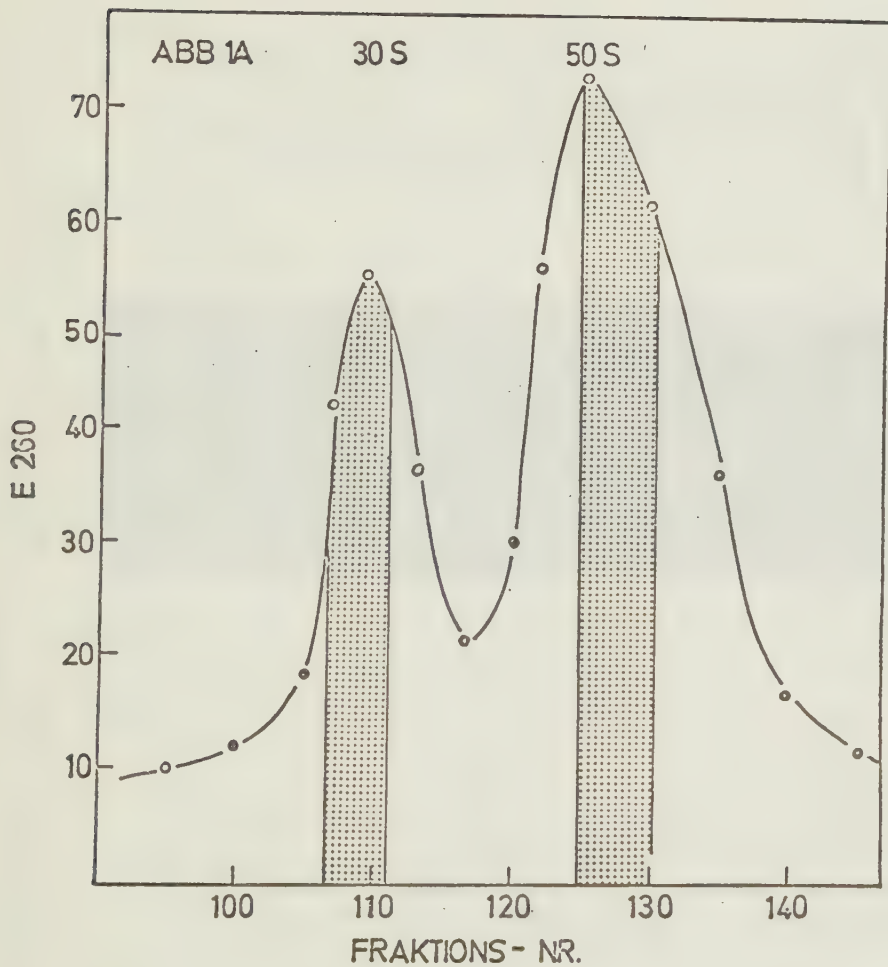


Abb. 1A :

Kurve der in 30S und 50S dissoziierten 70S Ribosomen nach der Zonalzentrifugation.

Die punktierten Bereiche geben an, welche Fraktionen zur Gewinnung der Untereinheiten gesammelt wurden.

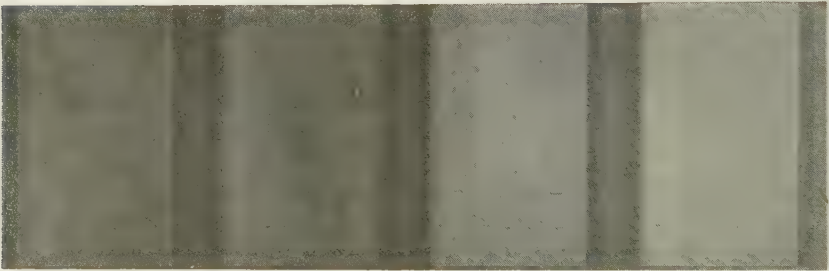


Abb. 1A₁ :

Sedimentationskurven der Untereinheiten, die aus einem Zonallauf mit 70S Ribosomen stammen.

Oben: 50S, unten: 30S Untereinheiten, aufgenommen mit der Schlierenoptik in der analytischen Ultrazentrifuge.

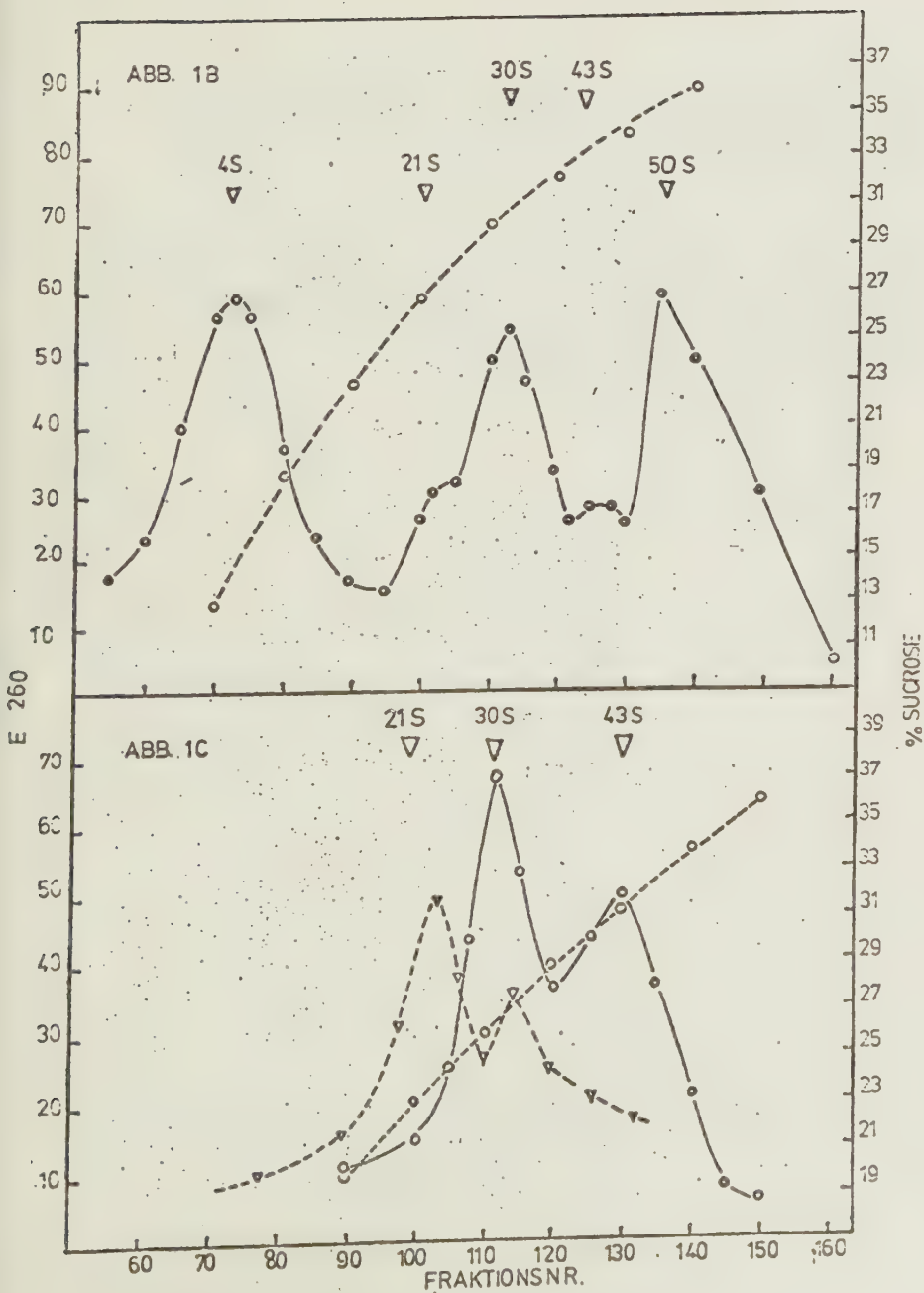


Abb. 1B :

Kurve einer Rohextraktzentrifugation im Zonalrotor. Der "4S" Gipfel enthält die Zellbestandteile, die kleiner als die Ribosomenuntereinheiten sind.

Abb. 1C :

Kurven der rezonanzisierten 43S und 21S Fraktionen

●—●—● Absorption bei 260 nm (Rohextrakt und 43S)

▼---▼---▼ Absorption bei 260 nm (21S)

○---○---○ Sucrose - Konzentration

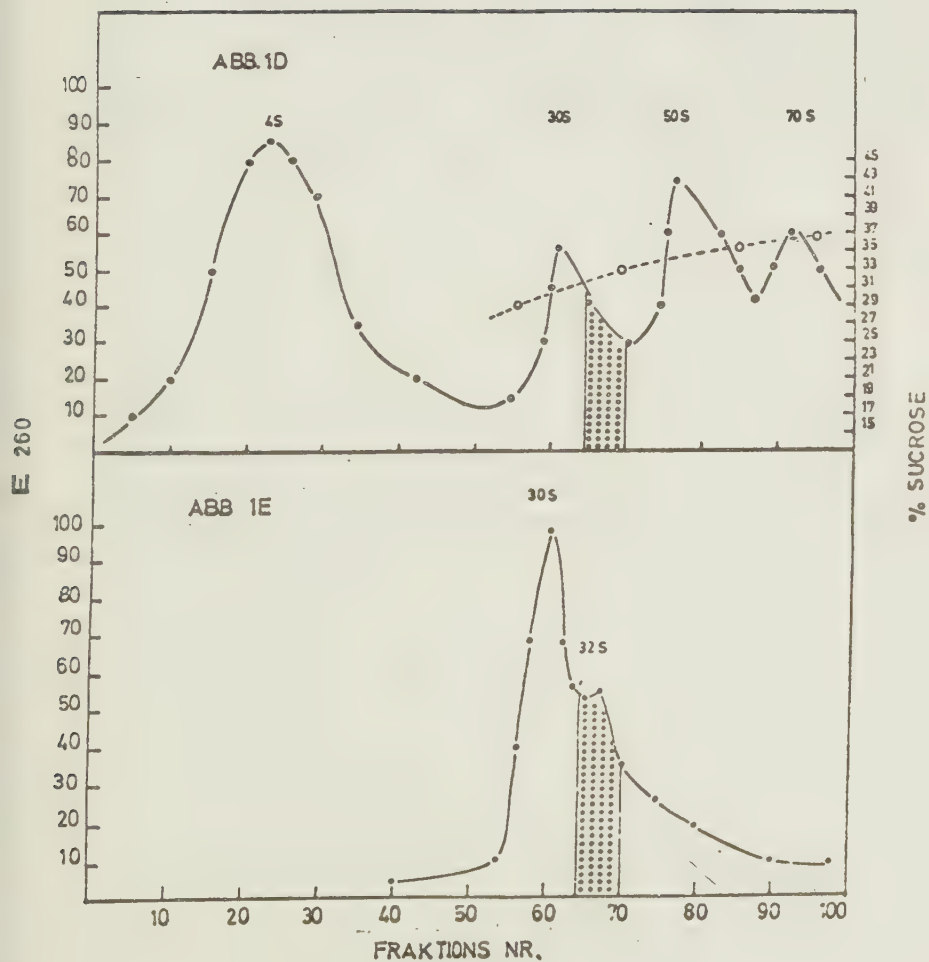


Abb. 1D :

Kurve einer Rohextraktzentrifugation im Zonalrotor, wobei der Rohextrakt, wie in Material und Methoden beschrieben, vorbehandelt wurde, um 32S Vorstufen gewinnen zu können.

Abb. 1E :

Kurve der rezonalisierten 32S. Die punktierten Bereiche zeigen, welche Fraktionen gesammelt wurden.

●—●—● Absorption bei 260 nm
○---○---○ Sucrose - Konzentration



Abb. 2:

Sedimentationsläufe von Rohextrakt, mit der Schlierenoptik aufgenommen.

Die obere Kurve zeigt einen Rohextrakt, der mit Puffer 12 behandelt wurde, die untere Kurve einen Rohextrakt in einem Puffer mit 1M NH_4Cl .

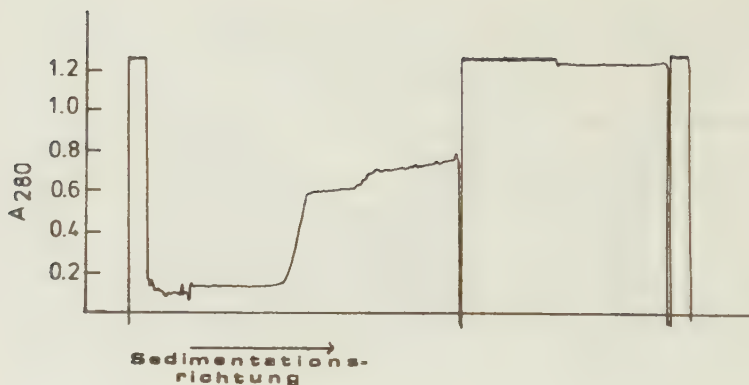


Abb. 3A :

Sedimentationskurve der 43S Vorstufe in der analytischen Ultrazentrifuge, aufgenommen mit UV-Optik und Scanner.

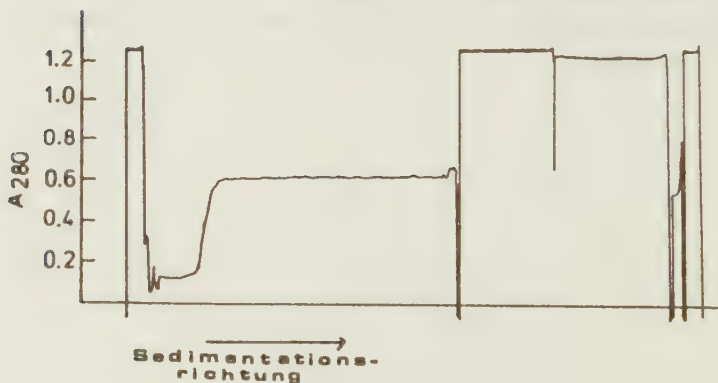


Abb. 3B :

Sedimentationskurve der 21S Vorstufe.

Die Zentrifugation wurde bei 40 000 Upm und 20°C ausgeführt. Die Kurven zeigen die Sedimentation etwa 16 Min nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit.

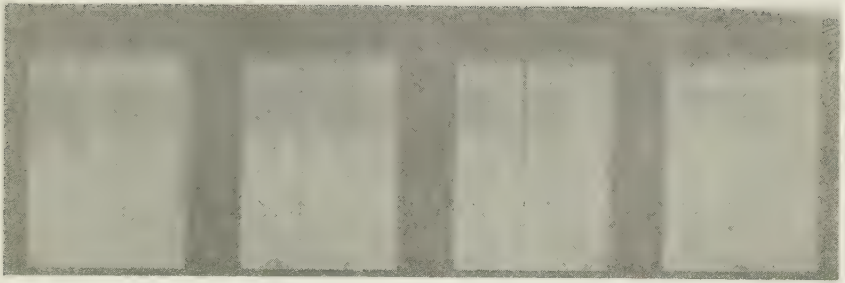


Abb. 4 :

Sedimentationskurve für ribosomale RNA, aufgenommen mit der Schlierenoptik. Die obere Kurve zeigt 16S RNA in großer Konzentration (dunkle senkrechte Linie) und etwas 23S RNA. Die untere Kurve zeigt zum Vergleich 30S Untereinheiten, die allerdings in zwei Gipfel aufspalten.

ABB 5A

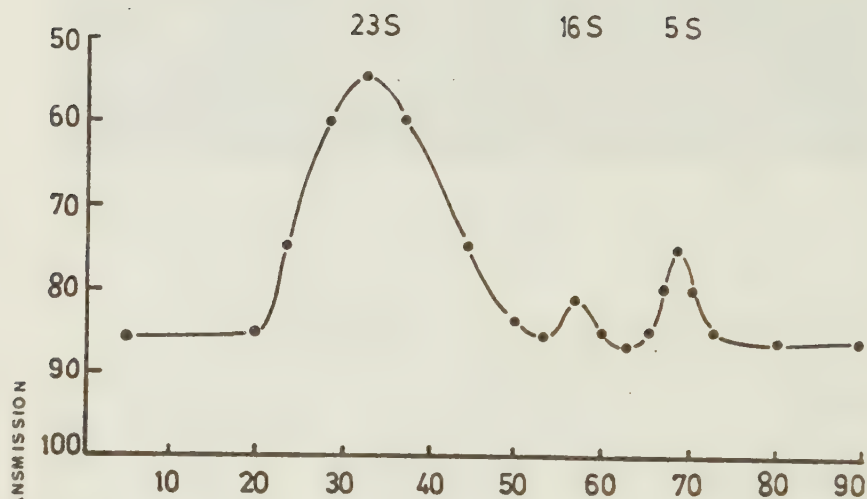


ABB 5B

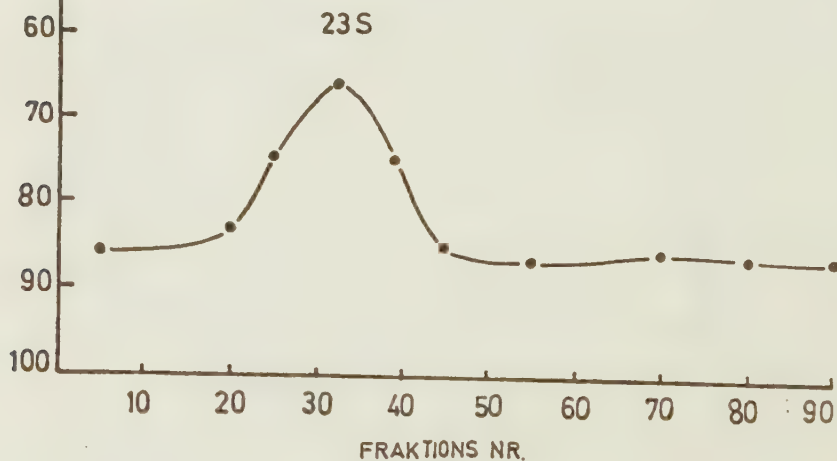


Abb. 5A :

Transmissionskurven der RNA Bestandteile der 32S Präparationen.

Abb. 5B :

Rechromatographierte 23S Fraktionen.

Abb. 6 :

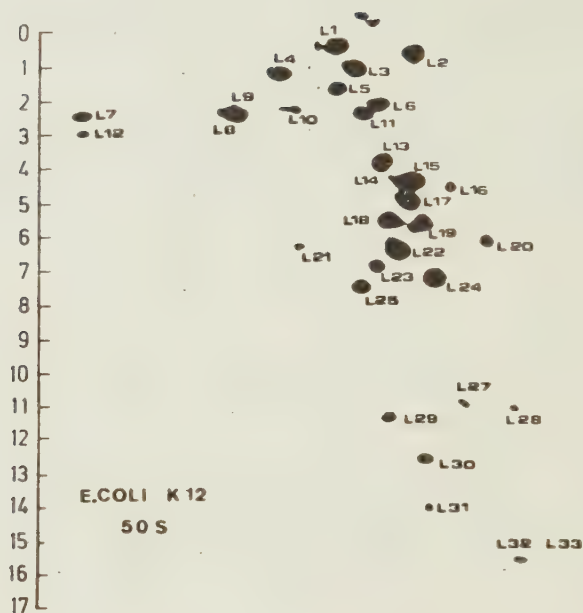


Abb. 7 :



Abb. 8 :



Abb. 9A :



Abb. 9B

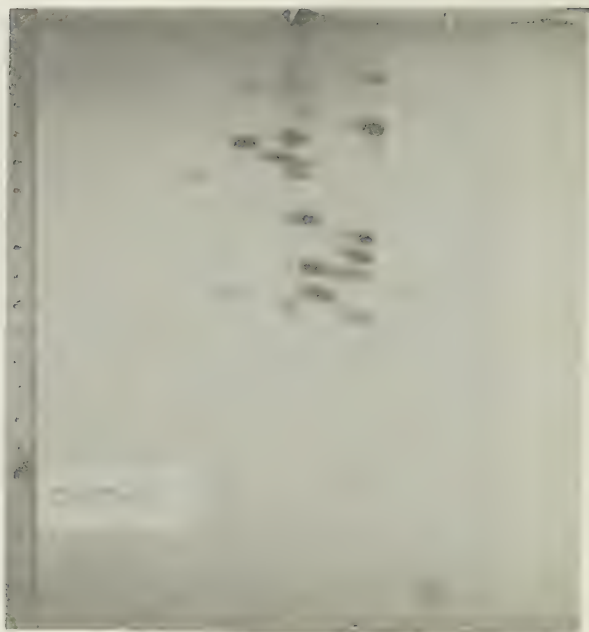


Abb. 9C



Abb. 10A :



Abb. 10B :



Abb. 10C :



Abb. 10D :



Abb. 10F :



Abb. 10F :



Abb. 10G :



Abb. 10H :



Abb 11 :

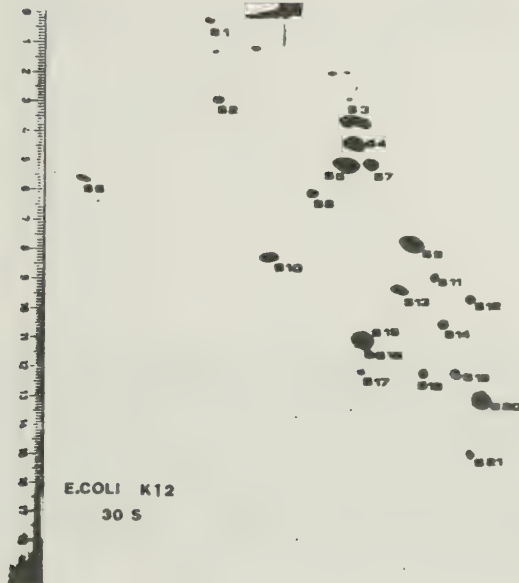


Abb 12:

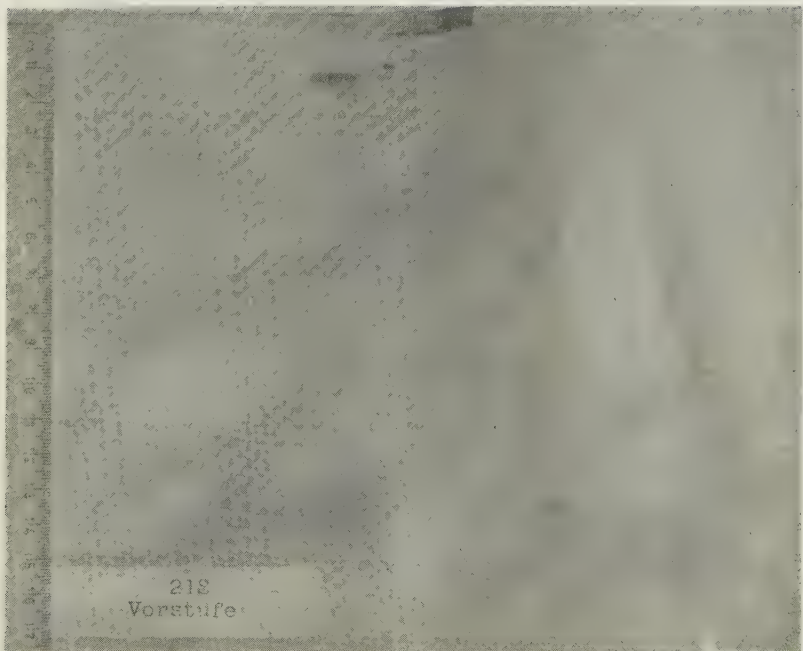


Abb. 13 :



Abb. 14A



Abb. 14B :



Abb. 6 - 14 :

Die Abbildungen zeigen die Proteinmuster der verschiedenen untersuchten Partikel.

Abbildung 6 und Abbildung 11 (die Proteinmuster von 50S und 30S Untereinheiten) sind mit der Berliner Nomenklatur für die ribosomalen Proteine beschriftet (Kaltschmidt und Wittmann, 1970b)

Die Proteine wurden mit der zweidimensionalen - Gel - Elektrophorese getrennt (Kaltschmidt und Wittmann, 1970a, Anhang).

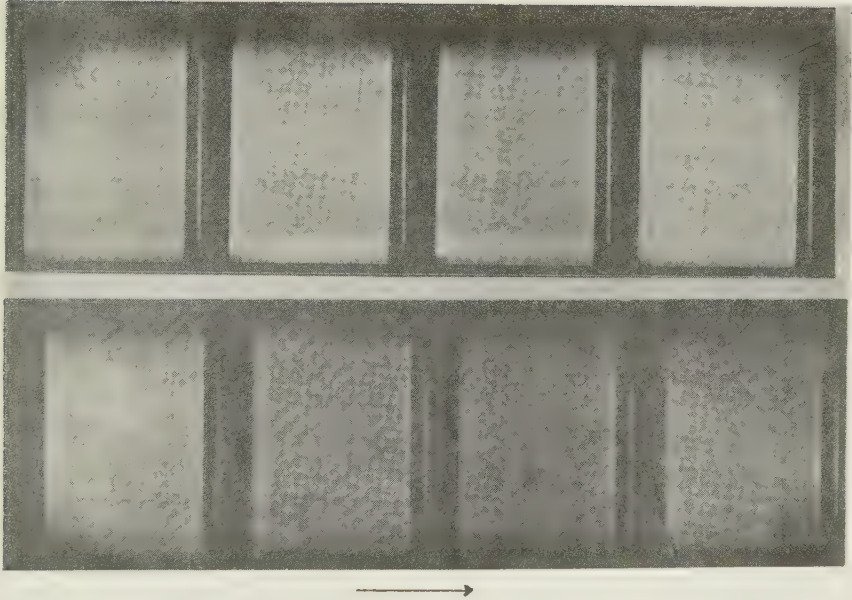


Abb. 15

Sedimentationskurven von den Partikeln L1-50-1M (oben) und Cs-CP-2 (3.von oben).

Die beiden anderen Kurven zeigen zum Vergleich die Sedimentation von 50S Untereinheiten. Diese Ribosomen waren in $10^{-3}M$ $MgCl_2$ eingefroren, dadurch ist ein Teil der Partikel aufgefallen und sedimentiert langsamer (etwa 35%),

VII. Literatur

ATSMON, A., SPITNIK - ELSON, P. and ELSON, D. :

Characterization of the particulate and free protein obtained after treatment of ribosomes with 2M lithium chloride.

J. Mol. Biol., 25, 161 (1967)

CRICHTON, R.R. and WITTMANN, H.G. :

Ribosomal proteins. XXVI. Trypsin digestion as a possible probe of the conformation of E.coli ribosomes.

Molec. Gen. Genetics, 114, 95 (1971)

EICKENBERRY, E.F., BICKLE, T.A., TRAUT, R.R., PRICE, C.A. :

Separation of large quantities of ribosomal subunits by zonal ultrazentrifugation.

Eur. J. Biochem., 12, 113 (1970)

STÖFFLER, G. , RAK, K.H., DAYA, L., GARRETT, R.A. :

The number of specific protein binding sites on 16S and 23S RNA of Escherichia coli.

J. Mol. Biol., 62, 411 (1971)

GESTELAND, R.P. :

Isolation and characterization of RNAase I mutants of Escherichia coli.

J. Mol. Biol., 16 675 (1966)

GESTELAND, R.P. and STAEHELIN, T.S. :

Electrophoretic analysis of protein from normal and cesium chloride - treated E.coli ribosomes.

J. Mol. Biol., 24, 149 (1967)

GUTHRIE, C., NASHIMOTO, H. and NOMURA, M. :

Cold sensitive mutants defective in ribosomal assembly

Proc. U.S.N.A.S., 63, 384 (1969)

HOSOKAWA, K., FUYIMURA, R.K. and NOMURA, M. :

Reconstitution of functionally active ribosomes from inactive subparticles and protein.

Proc. U.S.N.A.S., 55, 198 (1966)

ITOH, T., OTAKA, E. and OSAWA, S. :

Release of ribosomal proteins from E.coli ribosomes with high concentrations of lithium chloride.

J. Mol. Biol., 33, 109 (1968)

KALTSCHMIDT, E. and WITTMANN, H.G. :

Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins.

Anal. Biochem., 36, 401 (1970a)

KALTSCHMIDT, E. and WITTMANN, H.G. :

Ribosomal proteins. XII. Number of protein in small and large subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

Proc. N.A.S., 67, 1276 (1970b)

KALTSCHMIDT, E., RUDLOFF, V., JANDA, H.G., CECH, M., NIERHAUS, K., WITTMANN, H.G. :

Isolation of proteins from 70S ribosomes of Escherichia coli.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1545 (1971)

KURLAND, C.G., VOYNOW, P., HARDY, S.J.S., RANDALL, L. and LUTTER, L. :

Physical and functional heterogeneity of E.coli ribosomes.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 17 (1969)

LERMAN, M.J., SPIRIN, A.S., GAVRILOVA, L.P. and GOLOV, V.P. :

Studies on the structure of ribosomes. II. Stepwise dissociation of protein from ribosomes by cesium chloride, and the assembly of ribosome-like particles.

J. Mol. Biol., 15, 268 (1966)

- Mc. CARTHY, B.J., BRITTEN, R.J. and ROBERTS, R.B. :
The synthesis of ribosomes in *Escherichia coli*. III: Synthesis of ribosomal RNA.
Biophys., 2, 57 (1962)
- MARCOT - QUEIROZ, J. and MONIER, R. :
Préparation de particules 18S et 25S à partir des ribosomes d'*Escherichia coli*.
Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 446, (1966)
- MANGIAROTTI, G., APIRION, D., SCHLESSINGER, D. and SILENGO, L. :
Biosynthetic precursors of 30S and 50S ribosomal particles in *Escherichia coli*.
Biochem., 7, 456 (1968)
- MESELSON, M., NOMURA, M., BRENNER, S., DAVERN, C. and SCHLESSINGER, D. :
Conservation of ribosomes during bacterial growth.
J. Mol. Biol., 9, 696 (1964)
- MIZUSHIMA, S. and NOMURA, M. :
Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *Escherichia coli*.
Nature, 226, 1214 (1970)
- NOMURA, M. and ERDMANN, V.A. :
Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociate molecular components.
Nature, 228, 744 (1970)
- NOMURA, M., MIZUSHIMA, S., OZAKI, M., TRAUB, P. and LOWRY, C.V. :
Structure and function of ribosomes and their molecular components.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 49 (1969)
- OSAWA, S.:
Biosynthesis of ribosomes in bacterial cells. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Academic Press, New York and London, 4, 161, (1965)

OTAKA, E., ITOH, T., and OSAWA, S. :

Protein components in the 40S ribonucleic particle in E.coli
Science, 157, 1452 (1967)

ROTH, H. :

Poly-U-abhängige Proteinsynthese: Präparation hochaktiver
ribosomaler Untereinheiten von Escherichia coli.

Diplomarbeit, Berlin 1971

SELLS, B.H. and DAVIES, F.C. :

Biogenesis of 50S particles in exponentially growing Escherichia
coli.

J. Mol. Biol., 47, 155 (1970)

SPITNIK - ELSON, P. and ATSMON, A. :

Detachment of ribosomal proteins on the amount of protein
detached.

J. Mol. Biol., 45, 113 (1969)

TRAUB, P., HOSOKAWA, K., CRAVEN, G.R. and NOMURA, M. :

Structure and function of E.coli ribosomes. IV. Isolation and
characterization of functionally active ribosomal proteins.

Proc. U.S.N.A.S., 58, 2430 (1967)

TRAUB, P. and NOMURA, M. :

Structure and function of E.coli ribosomes. I. Partial fractionation of functionally active proteins and reconstitution of artificial subribosomal particles.

J. Mol. Biol., 34, 575 (1968)

TRAUB, P. and NOMURA, M. :

Structure and function of E.coli ribosomes studied in vitro.

J. Mol. Biol., 40, 391 (1969)

Lebenslauf

- 30.3.1945: geboren als Tochter des Kaufmannes Gerd
Niederste - Muthmann und seiner Frau Erna
geb. Schnecke in Körbecke
- 1951 - 1955: Volksschule in Duisburg
- 1955 - 1964: Frau Rat Goethe - Schule
neusprachliches Mädchengymnasium, Duisburg
- 5.3.1964: Abitur an der Frau Rat Goethe - Schule
- SS 1964 - SS 1966: Studium der Biologie an der
Philipps - Universität Marburg
- WS 1966/67: Beginn des Studiums der Biologie an der
Freien Universität Berlin
- 1968: Vordiplom der Biologie an der natur-
wissenschaftlichen Fakultät der
Freien Universität
- Oktober 1969: Beginn der Dissertation am
Max - Planck - Institut für Molekulare
Genetik in Berlin

